

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：38005

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890289

研究課題名(和文) 癌の進展におけるCCR4-NOT複合体の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of CCR4-NOT complex in cancer progression

研究代表者

白井 陽太郎 (Yo-taro, Shirai)

沖縄科学技術大学院大学・細胞シグナルユニット・研究員

研究者番号：30630545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：mRNA代謝異常が癌の進展に果たす機能に関しては未解明な点が多い。CCR4-NOT complexのサブユニットであるCNOT3のノックダウンにより、肺癌細胞の増殖が減弱することがわかった。さらに、他のCNOTサブユニットの発現もタンパクレベルで低下した。現在、microarrayを用いた網羅的解析により細胞増殖減弱のメカニズムを探っている。またCNOT3の過剰発現株を作製した。運動能や浸潤能への評価を施行し、CNOT3の肺癌における役割を解明する。

研究成果の概要(英文)：The relationship between the mRNA turnover dysfunction and the cancer progression is not well understood. I found that knockdown of CNOT3 in lung cancer cells by DOX-induced shRNA attenuates their proliferation. In addition, the expression level of other CCR4-NOT components was decreased by knockdown of CNOT3 at protein level. Currently, I am searching for the target genes of CNOT3 which are responsible for this growth inhibition of lung cancer cells by microarray analysis. In addition, I established the lung cancer cells in which CNOT3 is stably overexpressed. I am going to evaluate whether CNOT3 affects the motility and invasiveness of lung cancer cells, and also metastasis using xenograft model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：癌 デアデニレース mRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) CCR4-NOT 複合体は、真核生物において高度に保存された、多機能複合体である。当初は転写制御の役割のみが知られていたが、様々な生物学的作用を有することが明らかとなり、近年ではデアデニレーションによる mRNA 代謝回転の調節が特に注目されている。

(2) Ccr4p、Caf1p、5 種類の Not タンパク (Not1p-Not5p) Caf40p、Caf130p などの構成因子は酵母において同定され、特徴付けられてきた。哺乳類における構成因子は大部分が保存されている。しかし、酵母におけるデアデニレーズは Ccr4p、Caf1p という異なるタイプのものが 1 つずつしか存在しないのに対して、哺乳類では CNOT6/6L、CNOT7/8 という二つの ortholog が存在し、その中のいずれかが複合体に組み込まれていると考えられている (Lau et al., *Biochem J.* 2009)。また、他にも Not4p の ortholog である CNOT4 は哺乳類の CCR4-NOT 複合体には安定して結合していないこと、Not3p と Not5p の ortholog は哺乳類では CNOT3 のみであること、Caf130p の ortholog は哺乳類に存在しないこと、酵母には存在しないサブユニットが哺乳類にあるなど、一部異なる構成がみられる。また、酵母と哺乳類では、一部のサブユニットの機能に差があることが確認されている。哺乳類における CCR4-NOT 複合体は、CNOT1、CNOT2、CNOT3、CNOT6/6L、CNOT7/8、CNOT9、CNOT10 (その後、2013 年に CNOT11 も構成因子として同定された) から構成される。

(3) 哺乳類の細胞において、CNOT6L デアデニレーズが、標的遺伝子として、*Cdkn1b* (p27) をマウスの線維芽細胞で制御し、細胞周期を正に制御しているなど、(Morita et al. *Mol Cell Biol.* 2007) CCR4-NOT 複合体の細胞死および細胞増殖への関与が報告されてきた。近年になり、大腸癌やその転移巣における CNOT8 の発現の亢進 (Seiden-Long et al., *Oncogene.* 2006)、一部の血液腫瘍における CNOT6L と CNOT7 の発現の低下 (Maragozidis et al., *Acta Hematol.* 2012) などの報告がされ、CCR4-NOT 複合体の癌への関与の可能性が示唆された。しかし、ある特定の癌種に着目して、CCR4-NOT 複合体が発癌および癌の進行へおよぼす影響を調べた研究は、ほとんど行われていなかった。

(4) CNOT6/6L、CNOT7/8 についてはデアデニレーズとしての機能が既に知られている。一方で、CNOT3 の機能は、ノックアウトマウスの解析から、クロマチン構造変化による転写活性化の制御、そして CNOT6/6L、CNOT7/8 のデアデニレーズの作用を正に制御していると推察されている (Neely et al.,

Cell. 2010, Morita et al., *EMBO J.* 2011)。しかし、CNOT3 がどのようにしてその作用を及ぼすか、また細胞種依存的な作用が存在するか、などまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

重要なことに、本研究課題採用後の 2012 年末に、T 細胞急性リンパ性白血病における CNOT3 の変異の報告がされた (De Keersmaecker et al., *Nat Genet.* 2012)。さらに、Notch シグナルを亢進させた *Drosophila* モデルを用いて、CNOT3 を喪失させると腫瘍を引き起こすことが確認され、CNOT3 の発癌における重要性が示唆された (De Keersmaecker et al., *Nat Genet.* 2012)。

そこで、当研究では CNOT3 を代表とした CCR4-NOT 複合体の癌への進展における重要性に着目し、特に肺癌の進展における CCR4-NOT 複合体の役割を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

肺癌細胞株を用いて、癌細胞の増殖と転移という独立した観点から評価するために、CNOT3 の発現を、レンチウイルスを感染させることで、恒常的にノックダウンおよび過剰発現させた (図 1)。下記のレンチウイルスベクターはすべて理化学研究所・三好浩之博士より供与いただいた。

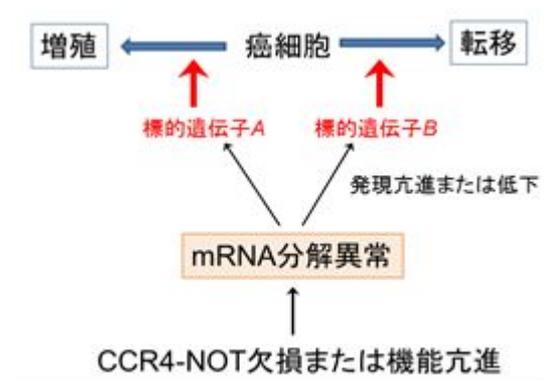


図 1 . 癌における CCR4-NOT 複合体の新規機能の想定モデル

(CCR4-NOT の発現逸脱に伴い、標的遺伝子 A もしくは B の発現が亢進あるいは低下することで、癌細胞の増殖もしくは転移に影響を及ぼすことを想定している。)

(1) ノックダウンに関しては、shRNA を発現するレンチウイルスを用いた。しかし、shRNA 発現株は細胞増殖が損なわれていたためか樹立が困難であった。そこで、テトラサイクリン制御下で shRNA を発現するレンチウイルスを用いて、発現誘導株を複数の shRNA に対して樹立した。

テトラサイクリンより強い活性を持つドキシサイクリン(DOX)処理後 2~3 日後に、各 CCR4-NOT 複合体の発現を mRNA およびタンパクレベルで評価した(定量的 RT-PCR およびウェスタンブロッティング)。また、細胞周期関連のタンパクや細胞死に関するマーカーなども評価を行った。さらに、DOX 処理 72 時間後の遺伝子変動の網羅的解析として microarray を施行した。DOX 処理 4 日後に、肺癌細胞株に対して細胞数をカウントすることで、CNOT3 ノックダウンの細胞死および細胞増殖に対する評価を行った(細胞増殖試験)。

また、siRNA を用いても、ノックダウン実験を行い、効果を確認した。

(2) CNOT3 の恒常的な過剰発現株を樹立して、他の各サブユニットへの発現の影響を mRNA およびタンパクレベルで評価した。

CNOT3 の細胞形態への影響を観察した。また、運動・浸潤能に関する遺伝子の mRNA レベルを評価した。さらに、運動能を評価するために wound closure assay を施行している。

4. 研究成果

(1) ノックダウンに関しては、DOX 処理 48-75 時間後において、2 種類の shRNA で CNOT3 の発現低下が mRNA およびタンパクレベルで確認された(shRNA#1 および#2)。

一方で、他の各サブユニットへの mRNA レベルでの発現量は、shRNA 間で共通した効果は認められなかったが、CNOT2 や CNOT9 を代表とした各サブユニットがタンパクレベルでは発現が低下していることを見出した。siRNA を用いた実験でも同様の効果を確認した。この効果としては、binding partner の欠失によるタンパクの不安定化による分解が機構として考えられるため、プロテオソーム阻害剤を用いて確認する予定である。

細胞増殖試験の結果、CNOT3 ノックダウンにより肺癌細胞株の細胞増殖が減弱することが分かった。そのメカニズムに対するものとして、大きく分類すれば細胞死と細胞周期の制御がある。

カスパーゼ依存的なアポトーシスが行われる際に、PARP の切断を受けることが知られている。DOX 処理後 48-75 時間後において PARP の状態を確認したが、切断を受けた PARP の増加は認められなかった。細胞周期への影響を調べるため、現在 RB タンパクのリン酸化状態の評価を施行している。また、フローサイトメトリーを用いて細胞周期解析を施行する予定である。

また、microarray に関しては現在解析中であり、標的遺伝子を探索している。

(2) CNOT3 の過剰発現を mRNA レベル(数十倍以上)およびタンパクレベルで確認した。他の各サブユニットへの発現は、mRNA レベルおよびタンパクレベルでも明らかに変化は認められなかった。CNOT3 の細胞内における局在を調べるため、免疫染色、そして細胞質および核の画分を分離したウェスタンブロッティングを施行する予定である。

CNOT3 の過剰発現により、コントロールの親株および GFP 発現株と比較して、大きくではないもののわずかに異なる細胞形態もしくは細胞接着への影響が観察された。その一因として浸潤・運動能への影響を調べるため、wound closure assay を施行しており、現在も評価を続行している。

また、運動・浸潤能に関与する様々な遺伝子の mRNA レベルを、CNOT3 発現株とコントロールの親株および GFP 発現株とで比較評価したところ、ある遺伝子 X が CNOT3 発現により大きく亢進していることを見出した。

また、CNOT3 の過剰発現による細胞増殖への影響も、細胞増殖試験を行い検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)
該当なし

〔学会発表〕(計1件)
白井陽太郎、山本雅
肺癌における CNOT3 の機能解析
第36回日本分子生物学会
兵庫県神戸市(神戸ポートアイランド)
2013.12.3

〔図書〕(計0件)
該当なし

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
<https://groups.oist.jp/ja/node/92>
(沖縄科学技術大学院大学・細胞シグナルユニット)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
白井 陽太郎 (SHIRAI, Yo-taro)
沖縄科学技術大学院大学・細胞シグナルユニット・研究員

研究者番号：30630545

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし